

基因治療臨床試驗基準（草案）



行政院衛生署食品藥物管理局

中華民國一百年二月

目次

前言	3
第壹章 細胞的製程與管控	3
一、細胞來源與收集 (collection)	3
二、種源細胞庫 (Master cell banks)、生產細胞庫 (Working cell banks) 及生產細胞 (Producer cells)	3
三、細胞培養	5
第貳章、基因療法各類載體的一般規定	8
一、載體建構 (vector construction) 和種源載體庫存 (master vector seed stock)	8
二、主檔案 (Master files)	9
三、製造批次的品管及出產測試，以及大量生產載體的考量	9
四、最終產物及分批之測試	11
第參章、基因療法各類載體的特殊規定	12
一、質體載體 (Plasmid vector)	12
二、反轉錄病毒載體 (Retroviral vector)	12
三、腺病毒載體 (Adenoviral vector)	19
四、其他基因運送系統	21
第肆章、細胞及基因治療之臨床前評估	21
一、總則	21
二、特殊考量—基因轉殖造成的非預期成果	21
三、動物品種的選擇與另類動物模型的使用	23
四、體細胞與基因改造過的細胞治療	23
五、免疫原性與免疫毒性	25
六、基因毒性(Genotoxicity)/致癌性(carcinogenicity)	25
七、直接輸入病人之載體的安全性測試	25

第伍章、載體製備過程的更改.....	27
一、載體結構.....	28
二、脂質及其他成份.....	29
第陸章、基因治療臨床試驗之臨床考量.....	27
一、一般考量原則.....	28
二、人體藥理學試驗(Human Pharmacology Studies).....	30
三、療效試驗.....	31
四、安全性考量.....	31
五、病人安全監測.....	33
六、長期安全監測計畫撰寫原則.....	40
七、對於嵌入性載體(integrating vector)之特殊考量.....	42
附錄.....	
[附錄 1-1] 決定 RCR 測試容積之數學推算.....	43
[附錄 1-2] 分析敏感度的實驗裁決.....	44
[附錄 1-3] 試驗之重複取樣數量之計算公式.....	45
參考文獻.....	46

前言

為確保基因治療臨床試驗合乎科學性、安全性及社會倫理性，並確保接受試驗者之權益，爰依據藥事法第四十四條，制定「基因治療臨床試驗基準」，說明基因治療產品申請臨床試驗時所需之相關技術性資料內容，包括：產品製程與管控、非臨床試驗及臨床試驗資料，以作為計畫主持人準備臨床試驗申請資料之參考。

本規範所稱「基因治療」(gene therapy)係指利用基因或含該基因之細胞，輸入人體內之治療方法，其目的在治療疾病或恢復健康。

第壹章 細胞的製程與管控

一、細胞來源與收集 (collection)

應說明細胞是屬於同種自體 (autologous)或同種異體 (allogeneic)，相關捐贈者的篩檢、配對等可參考「體細胞治療臨床試驗基準」。

二、種源細胞庫 (Master cell banks)、生產細胞庫 (Working cell banks) 及生產細胞 (Producer cells)

基因治療所用之載體，通常是在細胞株內繁殖製備得來，例如由細菌生產質體 (Plasmid)，或在哺乳類動物細胞生產重組病毒載體。這些生產細胞都需有詳細的來源紀錄、完善之庫存系統，及良好的品質管制。

(一) 細胞株來源

對於用來生產載體之細胞株，必須對其來源有詳盡的記載，包括：

1. 取自何種動物，以及動物的年齡與性別。
2. 若為人類細胞株，如可能，則供應者之病歷以及是否曾遭外來病原感染 (adventitious infection)之檢查結果。
3. 細胞株之培養歷史，例如從組織分離出細胞的方法，培養過程、培養基、

以及是否曾打入過動物體內等。

4. 所有定性分析及病原菌之測試結果。

(二) 一般性檢測

細胞株之生長方式及細胞形態都應有記錄，且需確保這些特性從種源細胞庫到最後所使用的生產細胞都沒有改變。若細胞株有特殊之標誌（marker，如染色體或細胞表面的標誌）可用來辨識，應檢測這些標誌的穩定性。若細胞只能有一定的培養期限，則需測出細胞至死亡前可做幾次的分盤培養。

(三) 細胞庫

用以生產載體之細胞株選定後，應準備一細胞庫以確保在整個生產過程中所需之細胞有穩定之來源，它的好處還包括可以用來詳細檢測細胞株、降低細胞間的相互混合污染之可能，以及檢測病原菌。一般會建立兩段式細胞庫系統：種源細胞庫及生產細胞庫。

種源細胞庫之定義為：從單一組織或細胞增生得來的同質性細胞群，它們應分裝、保存於液態氮內。帶有2倍染色體（diploid）細胞株之種源細胞庫，應從早期培養之細胞製備而來。從種源細胞庫之細胞解凍後，經過幾代的培養，將所有的細胞混合，分裝至安瓶(ampules)中保存，即為生產細胞庫，此細胞庫為用來生產大量載體之細胞來源。若要使用到一個以上的生產細胞庫安瓶，在解凍時要將所有的細胞混合後再培養。用來生產載體的細胞，應在一定的培養期間內使用。

這兩種細胞庫應保存於液態氮內，每一個安瓶的位置、內容及清單都應詳加記錄；最好都有兩個以上的存放地點，以避免細胞株之遺失。

(四) 細胞庫的品質管制

應詳述細胞庫的特性，包括合適的測試來證實細胞的安全性、鑑別（identity）、純度及安定性。也應評估有無實施測試以證實下列事項：

1. 確定無污染物質：例如細菌、黴菌、黴漿菌(mycoplasma) 及病毒。對於生產質體之細菌種源細胞庫，需注意是否有外來噬菌體(adventitious phage)污染，因為噬菌體會影響質體製造的穩定性及產量。對於脊椎動物或昆蟲細胞之種源細胞庫，也應排除所有黴漿菌或病毒的污染。
2. 細胞特性的鑑定：應以適當之基因型 (genotypic)和表現型 (phenotypic) 之標誌來確認，這些標誌也可以用來計量細胞族群的純度。這些特性包括：細胞形態（用光學或電子顯微鏡）、來源的動物種類及性別、限制酶圖譜、載體分子的數目、載體產物的活性等，而且需確定這些特性的穩定度。

生產過程中若需要將細胞從含血清的培養基中移到無血清的培養基，則需重新挑選單株細胞來做種源及生產細胞庫，以維持細胞的生長速率。

三、細胞培養

（一）培養基

包括製造時所使用的各種培養基、試劑／成分的文件，並附上相關分析證明書 (COA)。若使用有專利的培養基或添加物，則在申請計畫時也應附上這些專利的必要資料。所用的血清及添加物成分源自反芻動物時，應記錄是否來自發生牛海綿樣腦炎病 (bovine spongiform encephalopathy)，或有相當風險存在有牛海綿樣腦炎病的國家。有關BSE與其他動物衍生成份之管制，請參照行政院衛生署的最新公告。

動物血清可能會對人體造成過敏反應，因此，最好能儘量降低細胞培養時的血清用量。最終產物的血清或其他培養物之殘流量，需測量且不得超過1：1,000,000。若使用牛或豬的胰蛋白 (trypsin) 來取出細胞，則應確保內無污染物（包括牛或豬的微小DNA病毒，parvovirus）。

用來生產載體之細胞培養，應避免使用penicillin或其他 β -lactam類之抗生素，因為它們可能會對一些人造成過敏反應。如果必須使用抗生素，最好選擇臨床上較不常用之抗生素（如kanamycin），使用極少量的其他種抗生素或許可以容許，但一般來說最好避免。且最終產物放行規格必須設定抗生素殘餘量的允收標準，並於臨床試驗計劃書中放入適當的排除條件（exclusion criteria）及正確的受試者同意書（informed consent），來處理病患可能的敏感性。

（二）細胞培養程序之操作

細胞之種類可分為單層細胞（monolayer）及懸浮細胞（suspension），可被培養的時間又分為短期、長期及永久的培養。若使用只能短期培養的細胞來生產載體，則載體可從單一次的培養液或多次的收集而得來，若是分批次的收集，則品管的測試要針對每一批次在混合之前進行。若是使用長期培養的細胞來生產載體，則可將多次的收集物混合成一大量（bulk），品管測試可在混合後進行。品管檢驗的方法，要有最高的敏感度，而且長期培養細胞的連續使用期限也要有所限制。

細菌及真菌污染的檢查要包括未處理過的混合液、最終混合液及最終的產物成品。所謂未處理過的混合液是指將細胞培養液混合，其中含均質之混合物可以用來製造成單一批次的產物。在過濾、沈澱或其他處理之前，就應測試是否有外來物之污染。最終產物成品是指經過濃縮、純化的均質溶液，且可分裝出產的成品。

（三）品管測試

品管測試包括細菌、真菌、黴漿菌及外來病毒性病原（adventitious viral agent）污染的檢查，以及細胞引發腫瘤能力的測試。

外來病毒性病原 (adventitious viral agent) 的測試包括：

1. 例行測試：培養的細胞在製造完產物後，應觀察是否有一般病毒感染情形，如果產物是分批收集的，則每次收集的培養液都需做此檢查。檢查方法是取一適當的量來接種細胞至少三種類型的單層細胞，包括①與生產細胞同種和同組織型的單層細胞。②人類雙倍染色體單層細胞。③猴子腎臟單層細胞。用來做測試的樣本應避免稀釋，且受試細胞應觀察至少2星期，以觀察是否有細胞病態(cytopathic effects)或附血性病毒(hemadsorbing virus)。若生產細胞可受人類巨噬病毒(HCMV)感染，則受試細胞應至少觀察4星期。另外也需取測試樣本之培養液或溶解液(lysates)，進行體內病毒測試，將測試樣本接種至成鼠及乳鼠 (adult and suckling mice)，及雞胚胎蛋 (embryonated hen eggs) 內。有些案例，可能需接種至天竺鼠、兔子或猴子體內進行測試。此類分析的指標是測量受測動物有無出現疾病。
2. 特殊測試：需考慮所用細胞株之組織來源及病人病例而決定是否要檢測特殊病毒的污染。例如齧齒類(rodent)細胞株特有的病毒種類可用老鼠的抗體反應來偵測(如mouse, rat, and hamster antibody production tests)。另外也需做lymphocytic choriomeningitis病毒(LCM)的活體試驗。人類細胞應考慮人類病原病毒 (如EBV, HBV, CMV, HCV等)。這些病毒可用適當生化學或免疫學方法來檢驗。
3. 反轉錄病毒之測試：樣本是否有反轉錄病毒污染，可使用①利用穿透式電子顯微鏡(transmission electron microscopy)觀察。②樣本在高速離心下(125,000 X g/1 hr/4°C)所得沉澱物質之反轉錄酶活性檢驗。③感染力檢驗：為增加檢驗的敏感度，一般可先將測試樣本接種至可提供病毒生長之細胞株 (如*Mus dunni*或SC-1) 共同培養，使較低量污染之病毒增生後，再利用螢光抗體免疫法或S+L—方式檢驗培養液中是否有反轉錄病毒的存在。④亦可利用聚合酶鏈反應 (PCR)、探針雜交技術 (probe

hybridization) 及病毒之單株抗體來檢查是否有病毒之污染。

4. 引發腫瘤之測試: 使用齧齒類細胞株一般不需另檢驗是否會引發腫瘤(因此類細胞一般均有致瘤性), 但是有些人類表皮細胞或某些細胞療法或基因療法所用的特殊細胞株, 就得試驗其引發腫瘤的可能性。需使用裸鼠或免疫系統被抑制或缺陷的新生小鼠或其他鼠類來檢驗其引發腫瘤的能力。測試方法為皮下 (subcutaneous) 或肌肉 (intramuscular) 接種 10^7 細胞/0.2ml 培養液。每一測試至少要接種10隻動物。而且要使用正在生產載體階段的細胞, 另外, 也應包括10隻接種癌細胞的對照組動物, 且對照組應至少有9隻要長出腫瘤。若接種的是初生動物, 則所使用的對照組細胞 (如KB, HT-1080, FL) 應有癌轉移的現象。使用初生動物時, 要在出生第2、7及14天分別用皮下或肌肉注射0.1 ml 的ATG (antithymocyte globulin) 或ATS (antithymocyte serum) 來抑制其免疫系統的發育。被接種的動物應定期觀察及觸診以檢查腫瘤的出現。任何突起都應測量其大小並記錄, 若此突起在觀測期中開始有萎縮現象, 則應在突起消失前, 將動物做病理解剖。若動物有持續長大之突起, 應繼續觀察1~2週。對於沒有長出突起的動物, 半數應再觀察3週, 另一半觀察12週, 再做病理解剖, 並檢查接種部位、淋巴結、肺、腦、肝、腎、脾臟等器官是否有腫瘤形成, 因為有些細胞雖無明顯的外表腫瘤, 但細胞會轉移至其他器官。除了活體試驗外, 也可用體外實驗來檢查形成腫瘤的能力, 例如: 在軟洋膠 (soft agar) 或組織培養 (organ culture) 上形成群落 (colony) 的能力, 尤其是適用於一些尚無引起腫瘤能力的早期細胞株。

第貳章、基因療法各類載體的一般規定

一、載體建構 (vector construction) 和種源載體庫存 (master vector seed stock)

建構載體之各段DNA來源, 都需徹底了解清楚, 除非已有構造相似的載體已被定序完成, 否則載體任何重要部分的核酸序列, 都應利用直接定序方法 (direct sequencing) 加以確認。對某些類型載體, 整個結構都應被定序, 但對一些載體 (

如較大之病毒)，並無法完全定出所有序列，則至少要定出所插入基因、鄰接區域及任何經大幅改變的載體主幹部分之DNA序列。所有序列資料應以電腦檔案儲存。其他用以確認載體構造之方法，例如：限制酶圖譜（restriction enzyme mapping）、雜交反應（hybridization），或聚合酶鏈反應（PCR），都可在建構過程中使用，但是對最終的載體構造，其基因表現部分（包括調控區及插入之基因）則需應用直接定序之方法來確認。

在建構載體時，若最終構造需含一段選擇標誌基因（selection marker），則最好使用抗ampicillin基因以外的選擇標誌基因。

病毒載體或質體（plasmid）的種源庫存需經由分子選殖（molecularly cloned）的方式製備，且其構造應加以確認。用以調節載體與寄主間相互作用的載體序列，以及寄主細胞與載體系統的穩定性，都需加以確認。種源庫存不可以有任何外來物包括細菌、真菌及其他不應存在之病毒污染，若載體是由脊椎動物或昆蟲細胞培養中分離得來的，則更需確定無黴漿菌之污染。

二、主檔案（Master files）

有些載體可能會被用於數種不同的臨床試驗上，則可用一主檔案來記載此載體，以簡化計畫書及避免重複申請的步驟。主檔案所記載的載體資料，只是提供使用此載體於臨床試驗時審核的參考。在不同病人身上使用同一種載體，可能會產生不同的結果或造成不同程度的風險，所以，事先審視主檔案之資料可幫助提早發現或解決這些問題。

三、製造批次的品管及出產測試，以及大量生產載體的考量

一般性的測試方法將說明如下，但是若一系統有特殊之生物特性及危害，則需有其他特別之測試方法。如果使用之系統將只做一次大量的生產，且不再經過任何進一步的製備步驟，則不需做下列的測試。

大量之載體生產，都需用下列或類似方法檢驗下列性質。任何之檢驗都需包括對照組（即為已知量的檢驗）以確保檢驗結果無誤。這些分析之方法與結果，都需附於申請之計畫書中。

（一）純度測試

1. 所得載體之DNA或RNA總量，可用A260/A280。
2. 檢驗DNA之大小，均質性（homogeneity）、構造、是超螺旋（supercoiled）或線性（linear）結構，可用電泳膠片法。
3. 是否被RNA或寄主DNA污染，可用電泳法或E. coli的探針（probe）來檢驗。
4. 是否有蛋白質污染，可用電泳膠片銀染色法（silver stain）。
5. 是否有無感染性（non-infectious）病毒，如空蛋白殼（empty capsids）的污染。請參閱下列關於腺病毒（adenovirus）載體之介紹。
6. 產物中是否含有毒物質。

（二）驗證測試

1. 使用數種限制酶來確認載體之限制酶圖譜。
2. 若在同一設備內製造數種不同的載體，需有可用以分辨不同結構之載體的方法。

（三）安全性測試

1. 嗜氧性(aerobic)及厭氧性(anaerobic)的細菌或真菌的污染檢驗。
2. 若使用的是脊椎動物或昆蟲類的細胞株，需檢驗是否有黴漿菌（mycoplasma）污染。
3. 檢驗是否有外來的及有複製能力之病毒的污染。製造載體之來源，常有遭受病毒污染之風險，有時在建構有複製缺陷（replication-defective）

之病毒載體時，也可能遭受同類之可複製（replication-competent）病毒之污染，這些可能都需加以檢驗並排除。

（四）活性測試（potency）

在製造過程中要有適當之活性測試方法，若無定量之方法，至少要有定性測試。活性測試主要為測量基因產物的生物活性，而不只是證明其存在，例如：若酵素之活性有治療之作用，則應測量此酵素將受質（substrate）轉換成產物（product）的能力，而不是只用免疫方法來檢驗酵素蛋白質上抗原的存在。要測量插入基因的表現能力，可將其轉移感染（transfection）至適宜之細胞內，以證明它可製造有活性的基因產物，並須測量產物活性之敏感度（sensitivity）及專一性（specificity）。

四、最終產物及分批之測試

載體產品在最後分裝放行前，都需針對下列各點做定量的、再確認的檢驗。

（一）純度、驗證、安全性及活性測試

如果大宗的生產物已經過檢驗，有些項目（如化學物質污染）可以不需重複的檢查。但每批產品應進行無菌（sterility）檢驗。特別是生產有複製缺陷病毒載體時，應檢查是否有可複製之病毒的污染。

（二）內毒素（endotoxin）檢驗

用LAL（Limulus Amebocyte Lysate）或其他檢測方法來證明產物不會影響測試。

（三）一般安全性檢驗

（四）測量製造過程中添加物之殘留量

第參章、基因療法各類載體的特殊規定

一、質體載體 (Plasmid vector)

針對質體DNA載體，上述的各項規定都需遵守。RNA、蛋白質及細菌的DNA在這種載體都屬污染物質，因此，要監測產物中是否有這類污染存在。一般而言，質體都很小，可以一次就完成定序。由質體衍生的DNA，例如直線型 (linear) DNA 在轉殖基因表現上可能沒有作用，因此可被視為是污染物質，所以它們的存在需受偵測及限制。對產物中超螺旋結構DNA的最低含量也應做出明確測定。有毒物質如ethidium bromide及cesium chloride需避免在質體純化的過程中使用，否則也需有定量的方法來檢驗毒物的存在，並定出毒物最低容許量。

對於質體之調控序列 (regulatory sequences)，須考量它們在轉殖或非轉殖細胞內的生物性作用。

質體載體有時會與脂質、局部麻醉劑及其他可加速DNA攝取的化學物質共同施用。若這些物質是在製造過程中添加的，則需有檢驗最終產物內其含量及偵測的方法。若使用如chloroform類的毒性有機溶劑來製造脂質物，則應再加工去除，且產品放行前應檢驗其殘餘量。

二、反轉錄病毒載體 (Retroviral vector)

(一) 具複製力之反轉錄病毒(Replication Competent Retrovirus，以下簡稱RCR)測試

本節適用反轉錄病毒載體擬使用於體內(in vivo)或活體外(ex vivo)的基因治療製劑，亦適用於追蹤監控病人。由於對反轉錄病毒感染之風險所知有限，下述測試方法係根據目前現有的知識而訂定，將來若有更多的研究結果，這些測試方法應作適當的修正。

1. 測試時間點

RCR從一開始種源細胞庫(master cell bank)的製備，到含反轉錄病毒載體之細胞培養上清液取得的過程中都可能產生。並且，本不易被偵測之微量RCR污染源，會在體外生長的轉導細胞中增生。所以，基因治療製劑之生產過程中應該進行多步驟測試(參看表一)。藉由細胞庫系統的建立，可以保障載體生產細胞(Vector Producer Cells, VPC)供應之充分與持續性，種源細胞庫(Master Cell Bank；MCB)是由單一細胞種構成，生產細胞庫(Working Cell Bank；WCB)是由一個以上的安瓶之種源細胞庫取得，再以系列增殖達到一個特定的繼代數目。

表一 對基因製劑測試之建議

製造過程	來源	<u>RCR 測試-測試預期</u>		<u>RCR 測試-測試外生性</u>	
		<u>產生具複製力反轉錄病毒(RCR)株</u>		(Ecotropic)	MLV
		細胞	上清液	細胞	上清液
種源細胞庫(MCB)	由老鼠白血病毒(MLV)載體	+	+	+	+
	感染而得				
生產細胞庫(WCB)	由反轉錄病毒質體之載體轉殖感染而得	+	+	-	-
		+	或 +	-	-
最終生產細胞(End of Production Cells)		+	不適用	-	-
含載體之上清液		不適用	+	-	-
活體外轉導細胞	轉導後培養<4天	不需	不需	-	-
		(取樣存查)	(取樣存查)		
	轉導後培養≥4天	+	+	-	-

(1) 載體生產細胞之種源細胞庫之測試(Testing of Vector Producer Cell Master Cell Bank)(一次測試)

載體生產細胞(VPC)及其上清液在製造種源細胞庫時應該測其RCR，RCR之測試應以一種敏感細胞株來進行。例如，含二棲(amphotropic)老鼠白血病毒(MLV)包膜之VPC應以*Mus dunni*細胞株來測試MLV類似之RCR病毒。另外，像含長臂猿白血病毒(Gibbon Ape Leukemia Virus, GALV)包膜之VPC應以一種人類細胞株來測試RCR病毒。其他各種不同之反轉錄病毒包膜應以適當敏感細胞株來偵測不同的RCR污染物。

若在研製VPC時，所用之反轉錄病毒載體，須含帶一異種病毒(即異於原包裝用之反轉錄病毒，例如一外生性(ecotropic)的MLV)之替換包膜，則該替換包膜之來源病毒將可能被引入。縱使一個外生性的MLV VPC對人類並無直接的安全顧慮，不過，在一個具複製力基因體環境下的VPC，因為在人類宿主體內，該VPC之內容物可能引發基因重組，並製造一個新的RCR，而有危險之虞。

VPC用外生性的反轉錄病毒載體去感染細胞時，種源細胞庫(MCB)必須測試該外生性的RCR。它的細胞和上清液兩者都要接受測試，所用方法該以適當之陽性對照組(例如D56或XC)同時進行比對。請參照(2. 測試取樣量)以決定測試用量。

(2) 生產細胞庫測試(Working Cell Bank Testing) (一次測試)

以上清液進行RCR檢測，或是利用共同培養(co-cultivation)的方法測試細胞有無RCR，。其方法可參照種源細胞測試法。

(3) 反轉錄病毒載體上清液製劑及最終生產細胞(End of Production Cells)

之測試法

上清液生產批次和最終生產細胞都應該進行RCR測試，參考(2.測試取樣量)。重複測試可以相互佐證以確認反轉錄病毒上清液沒有RCR存在。

(4) 活體外轉導細胞(*Ex vivo* Transduced Cells)之測試

a. 轉導後4天內培養

轉導後至少需要4天的培養，使RCR增殖至可被偵測。因此，在培養少於4天的體外轉導細胞，應以取樣存查，來替代RCR實際測試。取樣存查之數量，請參考(2.測試取樣量)。採檢的樣品必須長期保存，並採取安全措施(例如，裝置具有警報監控功能之冷凍系統)，以及具有效追蹤儲存檢體之病人醫學病歷和生產批次紀錄。

b. 轉導後超過4天培養

當體外轉導細胞自轉導後培養4天以上，細胞及其適當量之上清液必須進行RCR測試，取量標準請參照(2. 測試取樣量)。體外轉導細胞在試驗中不能冷藏，且尚未能取得測試結果，但人體注射之計畫勢在必行時，在人體試驗進行之前，培養試驗必須立刻開始。在這種情況下，其他替代法例如PCR分析法可以採用，使用替代法時，必須提供有關該方法之敏感性、專一性、以及可重複性之資料。

2. 測試取樣量

(1) 上清液測試

測試時應該採用至少5%的上清液，以敏感細胞株進行增殖培養。不

過，如果上清液的總量超過6公升時，要採用5%的上清液作測試是不實際的。在這種情形下，使用任何替代法時，必須決定能偵測單一具感染力RCR病毒(a single infectious RCR)的最大試驗所需量。當高單位反轉錄病毒載體製劑被使用時，RCR的偵測上可能發生干擾現象。在如此情形下，因為單一具感染力RCR病毒之偵測可能只需很小劑量，每次需用極小劑量做出分析，如此替代法也不實際。所以鼓勵廠家自行研發，並建立比較敏感的替代性偵測法，來克服高劑量所面臨的干擾現象。

a. 替代法以決定供測試用之上清液總量

測試RCR所需反轉錄病毒上清液之總量可以統計法決定之。該計算方法係以Poisson分布法則(Poisson distribution)為依據，與生產批次之體積無關。該法建議，在100毫升液體中含有單一RCR顆粒之濃度下，測試足夠的上清液，以確保能獲得95%的偵測機率。在此濃度下，300毫升的溶液中，含有一個RCR的機率將達95%。所以，能夠偵測到單一RCR病毒的敏感度之試驗法，需要300毫升的容積以便達到95%的RCR偵測機率。更詳細的說明及所用數學公式請參閱[附錄1-1]。

為了支持能夠偵測到單一反轉錄病毒的假設，必須決定該特定的測試容積。總測試容積必須分成數個”重複取樣”的樣本，每一個樣本都可以測試出單一RCR病毒。目前已有ATCC之RCR標準株可以取得，此標準品可以做為對照參考，用來決定單一RCR病毒測試之容積取量。有關RCR標準品及如何決定”重複取樣”與其數目以便進行RCR偵測的詳細資料，請參考[附錄1-2]、[附錄1-3]。

b. 上清液的測試分析法

上清液的測試包括上清液以敏感細胞株(例如*Mus dunni*細胞株測試兩棲性的MLV)培養至少5個繼代，以期增殖任何可能的RCR病毒。增殖後的液體可以用適當的指示細胞(Indicator cell)作培養分析(例如PG-4 S+L-)。所有的分析法必須包含適當的陽性與陰性對照組，以評估該法的專一性、敏感性、及可重複驗證性。每一個反轉錄病毒載體上清液之製造批次，應該使用陽性對照品偵測是否具有抑制效果。

(2) 細胞測試

現行的建議是測試總細胞數量的1%，或者108 (兩者取其少數)，累集之載體生產細胞，或者體外轉導細胞，以敏感細胞株共同培養，仍然可行。因為考慮到生產細胞及載體的架構之多樣性，以及建立一個標準的RCR病毒生產之對照用細胞庫之困難度，所以，大家一致對細胞測試的共識仍然支持現行的建議方案。

細胞共同培養分析法應該包括一個敏感細胞株(例如*Mus dunni*細胞株測試兩棲性的MLV)進行至少5個繼代培養，以便增殖任何可能的RCR病毒。增殖後的液體可以用指示性細胞培養分析(例如PG-4 S+L-)。所有的分析法必須包含適當的陽性與陰性的對照組，以評估該法的專一性、敏感性、及可重複驗證性。

(二) 病人監控之建議

參與以反轉錄病毒載體為主之基因治療的病人，是否感染RCR病毒，將採主動監控來加以確認。本建議案，具體規範測試的時間點、為期20年之年度測試追蹤、以及採用的測試方法。

1. 測試時程表

本建議方案是以現有進行中以反轉錄病毒載體為主的基因治療所得的資訊為依據。這個監控時程表建議應該包括病人的檢體分析，其取樣時間如下：治療前、以及開始治療後3個月、6個月、一年、及之後的每一年（追蹤至治療後20年）。如果開始治療後第一年中的分析結果都是陰性的，此後每年的檢體都必須存檔保留。作取樣存查時，應採用安全措施，以便長期保存(例如，裝置具有警報監控功能之冷凍系統)，以及具有效追蹤儲存檢體之病人醫學病歷和生產批次紀錄。

如果開始治療後的檢體有任何是陽性的結果，必須採取進一步的RCR分析以及更徹底的病人追蹤，並與本署食品藥物管理局通報與諮詢。更進一步的建議在年度病人檢體蒐集時，應該取得一個簡要的臨床病歷，這個病歷應該專注在臨床症狀的判定，以及是否有反轉錄病毒傳染的可能性(例如癌症、神經系統疾病、或其他血液方面的異常)。臨床症候的懷疑可能促使存檔檢體的另外加項分析，以上必須與本署食品藥物管理局通報和諮詢。在臨床試驗中遇到病人死亡或引起腫瘤時，都應該進行屍體之器官、及腫瘤檢體之RCR病毒分析。

2. 建議試驗法

目前使用之兩種測試RCR感染方法如下：①RCR專一抗體之測試。②以PCR檢測病人的週邊血液單核細胞之RCR專屬的DNA。分析法之採用視載體給藥途徑及臨床症狀而定。例如，直接把載體生產細胞(VPC)注入人體，或重複直接將載體注入人體，可導致載體專一性抗體之產生，此抗體並不與RCR的存在有直接關係。因此，如果以載體或載體生產細胞直接注入體內，使用PCR分析法比血清偵測法來得恰當。尤其是對免疫機能不全的病人，其製造抗體能力不如理想，則以PCR分析法遠勝於血清偵測法。在任何情況下，所有陽性結果必須進一步以培養分析法來確認及鑑定具感染性的病毒。

(三) RCR測試結果之建檔

所有製劑之生產批次與從病人監控所得到的RCR測試結果，應該以新藥評估(IND)修正案格式做紀錄。病人監控所得的陽性反應結果，必須即刻當作藥品不良反應案例，以IND安全通報格式通報。陰性反應結果則以IND年報格式通報。

三、腺病毒載體 (Adenoviral vector)

(一) 病毒粒子 (particles) 與感染單位 (infectious units) 的計算

目前施用腺病毒基因治療載體到病人身上的劑量，是以病毒粒子的數量來計算。由於這些粒子本身可能會造成細胞毒性，所以必須算出病毒粒子的總數以及這些粒子感染轉殖細胞及運送載體的能力。

腺病毒粒子的計算，通常是用定量基因體DNA的方法。測量含SDS或其他溶解病毒溶液的OD260吸光值 (1 OD260等於 1.1×10^{12} 粒子)，可以計算出腺病毒粒子的數目。若有非腺病毒DNA核酸存在，會影響計算的準確性，所以在生產或純化病毒過程中要避免污染。另外也可用電子顯微鏡來計算病毒粒子的數目。

目前所謂腺病毒載體的劑量 (titer)，通常是指感染劑量。一般是用生產細胞株來計算此劑量。不同的病毒載體可能會影響細胞株的生長特性。利用溶菌斑 (plaque) 的方法，可以用來計算較易被互補的有複製缺陷腺病毒載體的數目。對於有多重複製缺陷的載體劑量，則可用螢光抗體TCID50方法測得。這兩種方法都需先注意病毒感染細胞所需的時間，最好用一個野生型病毒做為標準對照組。

在做第 I 期臨床試驗時，建議所使用之病毒載體應保持其病毒粒子數目與溶菌斑單位 (PFU)、感染單位 (IU) 或轉導單位 (TU) 的比例小於100 : 1

，以確保重組病毒產量的一致，且可獲得最大的生物活性、粒子數、病人劑量的效果，也能降低因病毒結構蛋白引發毒性的風險。

(二) 有複製能力腺病毒（以下簡稱RCA）的測試

腺病毒載體應無複製能力，因此，有必要偵測產物中是否含有複製能力腺病毒的污染。在生產過程中，很多步驟都有可能因與寄主DNA的重組或其他方式而出現RCA。生產過程中會產生RCA的多寡視載體的設計而不同。目前的建議是使用細胞培養致病力(cytopathic)來偵測RCA。這個偵測方法的敏感度，可以在測試樣本裏加入若干數目的野生型病毒粒子來確認。但最好不要用超過10~200個複感染（multiplicity of infection）來測試，因為過高的病毒接種量會引起和RCA沒有關連的細胞毒性。而且太高量的複感染也會導致載體抑制RCA的生長。可供RCA生長的細胞株（如293, A549）應經過一或二次的繼代（passages）使RCA繁殖，再用來與標示細胞（如HeLa）作用。另外，所使用的測試方法應為定量法，可以計算出RCA在病人劑量內的數目。目前的建議為病人劑量內應不含超過一個PFU的RCA，或至少證明所含RCA不會影響安全性。

進行臨床試驗的病人選擇標準，建議最好是選已對腺病毒有免疫反應，而且目前無腺病毒感染癥狀的病人。病患同意書中也應特別註明萬一遭腺病毒感染的可能後果。試驗過程中應檢查腺病毒的產生。

(三) 腺衛星病毒（adeno-associated virus）

因為此類病毒常與腺病毒同時存在，所以建議最好種源細胞庫、種源病毒庫存及最終產物都能檢驗是否有腺衛星病毒之存在。

(四) 用非消化途徑(parenteral)使用腺病毒載體的潛在危險

此種注射途徑有可能造成病毒在肝臟累積，因此最好檢查肝臟是否存有插

入基因產物。

四、其他基因運送系統

其他研發中的新運送系統，例如其他種類的病毒或核酸載體，其實驗規範將再視研究之進展程度而訂定。

第肆章、細胞及基因治療之臨床前評估

一、總則

臨床前試驗的目的為測定產品的藥理及毒理作用，以推衍初期人體臨床試驗及產品發展過程中人體的反應。試驗目標包括：決定人體臨床試驗的安全起始投與劑量及劑量增加之方式；測定產品在標的器官中引發的毒性及臨床試驗的觀察檢測參數；決定對該細胞或治療用之基因產品的毒性最敏感的高危險群的病人。

臨床前試驗應考量以下因素：①欲投與之細胞族群或載體種類；②與臨床使用最相關之試驗動物品種及生理狀態；③劑量、與臨床使用最相關之給藥途徑及治療方式。

基於細胞、基因產品的獨特性及多樣性，傳統的藥理及毒理測試方法不一定適用。試驗設計應考慮轉導基因之動物品種的特異性、病毒載體的感染性、動物生理差異性，若有與人體疾病型態相類似的動物模型，有助於提供進入臨床試驗之前所需的安全性及有效性資料。

國際醫藥法規協會（ICH）指導準則S6“生物製劑醫藥品之臨床前安全性評估”中，論及優良實驗室操作規範(Good Laboratory Practices, GLP)之依循彈性，雖然作為支持產品上市的樞紐安全性試驗（例如致癌性、生殖毒性），仍需依循GLP規範進行，然而支持進入人體臨床試驗的臨床前試驗可採用彈性的方式，唯仍應儘量遵行規範的原則，當有偏離GLP的情況發生時，應評估對臨床使用的影響，

並應在送交法規單位的報告中有所討論。

若產品與已有廣泛臨床使用經驗的產品類似，或插入不同表現系統(expression cassette)但預期並不會改變其毒性或不會改變載體的傳播，臨床前試驗或可酌量減免進行。

二、特殊考量－基因轉殖造成的非預期結果

未預期的基因轉殖結果包括插入基因的突變、引發細胞的變異和載體DNA的 mobilization，對於基因治療產品造成的品質影響應列入考量。

應考量新基因嵌入(integration)宿主基因的可能性-而近一步評估及討論，例如使用反轉錄病毒載體(retroviral vectors)或腺病毒載體(adenoviral vectors)。然有些基因治療產品使用的載體系統和給藥途徑，已經有相當的臨床和非臨床經驗，則經由適當的評估，可以利用相關的文獻資料來取代擬執行試驗。

評估載體嵌入人體基因的可能性或是可能產生非預期的可轉譯序列(coding sequence)的風險性，可以利用載體的序列與已知的人體基因序列作比對。目前仍不清楚載體基因序列與人體基因序列相同的程度，會增加嵌入的可能性。因此根據DNA嵌入宿主基因的可能性與預計使用的臨床適應症，研究腫瘤形成的可能性或是影響(disruption)正常基因的表現的試驗也許是必要的。

載體基因表現的所在位置(site)、分佈(distribution)與範圍(extent)，不論是預期的或是非預期中的表現都需要評估。適當的分析方法包括核酸擴增檢測法(Nucleic acid amplification technology, NAT)，例如利用原位(in situ)NAT或是反轉錄酶(reverse transcriptase, RT)NAT技術來分析基因的表現和轉錄，還有利用免疫分析方法和其他適當的分析技術來偵測基因表現產物。如果發現基因產物的表現在不應當出現的組織中時，表現的持續時間(duration)和基因存在的持續時間(持續性)也必須評估。特別是會分佈、表現或嵌入生殖細胞可能性的基因載體，需要審慎的評估研究，除非有其他理由可以說明，例如臨床適應症或是施用的病患族群不需要考慮生

殖問題。

基因表現在不適當的位置和/或表現不恰當的量的結果會產生非預期的影響。例如：在一般不會表現的受體(receptor)或離子通道(ion channel)的表現、酵素的過度表現(over expression)、生長因子或生長因子受體的過長時間(over prolonged)表現、或是造成其他基因的誘發表現或重新表現。

三、動物品種的選擇與另類動物模型的使用

並非每種細胞或基因治療系統都有類似人類疾病之動物模型，臨床前藥理及安全性測試應使用最適當、藥理最相關的動物模型，適當的動物模式因治療而產生的生物反應，應與人體反應類似，例如測試一種表現cytokine的載體時，選擇的動物品種，其cytokine與cytokine受體結合的親和力最好與人體相似，產生的藥理反應，也與人體反應類似。

四、體細胞與基因改造過的細胞治療

(一) 體內(in vivo)的生物、藥理活性

轉導步驟、增殖或基因改造過細胞之劑量、臨床試驗所預計使用的給藥途徑，應在臨床前試驗中評估。動物藥理試驗可提供該基因改造過的細胞在活體內之功能、存活時間及流向(trafficking)等有用之相關資訊。

(二) 毒理測試

增殖、被活化或基因改造過的體細胞的安全性測試應在適當的動物模型進行。此外，細胞在注回活體內後的分布、流向及持久性也應評估，最低限度應檢驗動物的一般健康狀態、血清生化檢驗、血液檢驗，標的組織應以顯微鏡做組織病理檢驗。

五、免疫原性與免疫毒性

如果是DNA疫苗，產生免疫反應來對抗基因表現產物是預期的結果，因此應有適當的試驗研究來說明產生免疫反應。

其他的基因轉殖產品，可能刺激產生細胞性免疫(cell mediated immunity)或體液性免疫(humoral immunity)來對抗核苷酸、載體衍生蛋白(如病毒蛋白)、表現蛋白、或基因重組細胞，所以都需要評估免疫原性。通常對轉入的載體或是構造產生免疫反應，可能會減低其有效性，而改變毒理測試結果。毒理試驗中監測免疫原性，可以幫助解釋試驗的結果，在一些例子中，產生自體免疫或是額外產生免疫反應可能造成毒性。

被當作佐劑的腺病毒攜帶子(carrier)一般會產生免疫反應，造成對抗基因表現產物。如果是一個外來同源 (homologue)自體蛋白產物，自體免疫反應可能會攻擊宿主的同源自體蛋白(自體耐受性被破壞)，當有這類狀況考量時，必須要有相關研究。

長期表現的外來抗原可能會造成非預期或不希望的結果，應以適當的動物試驗來說明此安全性的考量。這些安全性的考量包括可能因免疫系統的過度刺激產生的交互作用而產生自體免疫的可能性。同時，細胞也可能因轉入基因造成細胞表現的表面抗原變異，這樣的變異也可能影響自體免疫發生的可能性。當基因表現產品具有免疫調節(immunomodulatory)的機轉時，這樣的狀況必須要評估研究。

六、基因毒性(Genotoxicity)/致癌性(Carcinogenicity)測試

基因轉殖產品通常無須執行標準的基因毒性與傳統的致癌性測試。但是對於產品中的特定不純物或是傳遞系統中的成分執行基因毒性測試可能是需要的。

基因轉殖產品最需要考量的就是插入宿主基因造成突變的可能性，相關的討論與要求請參考「二、特殊考量—基因轉殖造成的非預期結果」節。偵測基因嵌入及表現所使用的分析方法必須清楚的描述並且偵測靈敏度之極限值與產生自發性突變率的相關性也必須討論。也可用其他不同的細胞株的體外測試方法，來測試插入突變可能造成的細胞型態(morphology)、功能、和習性(behavior)改變。如果在

NAT/RT-NAT檢測時發現有基因表現在骨髓之類的組織中，骨髓細胞生成(cytogenetic)和/或週邊血球細胞生成評估，可同時作為毒理/分佈試驗的一部份，也可以提供有用的資訊。

致腫瘤(tumorigenic)的可能性在一些基因產品也是必須被考慮的，例如非常長時間表現的生長因子或是生長因子受體，或是免疫調節劑。

七、直接輸入病人之載體的安全性測試

目前已有數種可直接輸入病人的載體正在開發中，直接將這種載體輸入病人體內會有安全性之顧慮。所有的毒性及分布試驗，包括生殖組織試驗，應使用最終劑型之產品，因為添加的物質例如liposome或改變pH值、鹽類含量等，可能會改變載體的毒性或分布型態。對各類載體特殊安全性之要求，應以個案審理，目前鼓勵申請者和審查單位討論。

(一) 載體給藥途徑(route of administration)

載體給藥途徑之不同，會影響其在體內之毒性。因此，在評估對動物及人體的安全性時，所用的載體給藥途徑與方法必須一致。若此要求無法達到(也許是因為受測動物的體積太小)，也應儘量使用類似的給藥途徑，例如對棉花鼠(cotton rat)或小鼠從鼻腔內注入(intranasal)做肺腔灌輸(intrapulmonary instillation)腺病毒載體，可用以取代支氣管鏡(bronchoscope)直接做肺內輸入之方法。

(二) 受試動物品種的選擇 (Selection of animal species)

做臨床前毒性評估的受試動物，應選擇可被與載體相關之野生型(wild-type)病毒所感染且會引發病理症狀之動物，亦需考慮是否適於評估載體引發的生物活性模式。若可選用對病毒敏感會引發病症的適當齧齒類動物模式，則非必要不需使用非人類靈長類動物。另外，在評估臨床適應症之動物模

式內的載體的活性時，亦可由同一模式收集安全性資料，以評估載體對於疾病相關生理及病理變化的影響。

(三) 劑量之選擇(Selection of dose to be employed)

臨床前研究所選用的載體劑量，應取決於體外及體內研究所得的結果；「無藥效劑量」，「明顯毒性劑量」，及數個中間劑量，並且包括適當的控制對照組。若產品的產量有限或是毒性很低時，最高可能投與劑量(maximum feasible dose)或可當為最高劑量。做臨床前研究之安全性評估時，應使用劑量等於及至少一個劑量大於臨床試驗用劑量，需要使用臨床劑量多少倍數的劑量以決定適當的安全性界限，則依載體的種類及動物模型而定。劑量之計算要考慮受試者之總重量或身體總表面積，才可做不同受試品種之間的比較。這些結果可用以決定臨床試驗時載體的安全性界限及可接受之劑量提昇(dose-escalation)計畫。

(四) 毒理測試(Toxicologic testing)

給藥的動物應檢驗其一般健康狀態、血清生化、血液及組織病理變化。

(五) 載體在輸入位置之外的分布(Distribution of vector out of the site of administration)

載體在輸入後是否會分布在預期的位置，也應加以研究。這種檢驗應儘量使用預計輸入之方法注射動物，可在另組的動物給予靜脈注射，以代表最糟情況之下載體的廣泛擴散的反應。基因是否轉移至正常、鄰近、遠端、或標的組織，應使用最敏感的偵測方法來檢驗，包括基因持久性之評估，劑量選擇應與毒性試驗一致。若發現有不正常的或非預期的載體分布狀況，則應繼續研究那些基因是否被表現，以及基因產物是否與病理現象有關。這些研究還應包括基因及其產物在轉殖與非轉殖器官內的持久性。

1. 基因產物的表現與免疫反應的引發

治療用之基因產物在預期轉殖或非預期轉殖組織的表現，可能造成非預期的毒性，所以，要在臨床前試驗中測試發炎反應、免疫反應、自體免疫等。動物試驗的時程都需夠長，才能讓這些反應顯現出來，而宿主對於病毒或轉殖基因蛋白質的免疫反應可能會限制臨床上重覆輸入的有用性。

2. 載體於生殖器官的分佈

將載體直接注射入組織的方法，應考量載體轉移至生殖細胞的風險，因此，若要採用直接輸入載體的方法，在臨床前之安全性研究時，就要特別分析載體進入生殖細胞的可能性。睪丸及卵巢的組織，要用敏感度最高的方法來檢測是否有載體的基因存在。如果生殖組織含有載體基因之序列，應檢測其生殖細胞(非基質細胞)，檢測方法例如原位(in situ)PCR法、或細胞分離法等。另外，也可自成熟的動物，如小鼠精液內檢測是否有載體移殖入生殖細胞的現象。

(六) 宿主免疫狀態及對基因治療載體的影響(Host immune status and effects on gene therapy vectors)

接受基因治療者，尤其是將接受病毒載體者的免疫狀態，在作效益與危險評估時應加以考慮。當臨床試驗排除免疫功能不全的病人，會造成過度限制臨床試驗進行的話，可於臨床前試驗時，在免疫抑制、遺傳性的免疫缺陷或新生的動物上先評估其安全性。

第五章、載體製備過程的更改

一般而言，新的生物性產品都需向本局申請使用核可，但是若有類似的載體已被使用，或是只在載體部份做些微的改變，可視為同一類的載體，但是仍需遵守放行測試的規

定及進行適當的臨床前試驗。若同類載體有相似的結構、相同的使用目的及相似的生物性效果，則其臨床前試驗可以經本局同意而免除。

上述情形，對於組織分布、生殖系改變及動物藥理毒性之臨床研究，可不須重複試驗；對安全性研究，可只針對載體改變的部分進行。這些情形包括相同的載體而有不同但相似的插入基因，或是為降低產生可複製病毒的可能性所做的載體修改，以及使用不同質體與脂質的比例等情形。

一、載體結構

(一) 載體主幹 (Vector backbone)

載體主幹的一些修改，可能使載體被視為新產品，例如有些些微改變會影響載體的安全性。此種情形載體需進行完整的安全性測試，包括臨床前動物試驗。反之，有些主幹就算有較大幅度的改變，卻對安全性影響極小，則可簡化其測試。每種情形都需經個案申請審查，每個案例中，都需提供質體結構的確認資料。

若只改變用以生產質體的細菌寄主，則需做質體構造的確證實驗，但不需做臨床前之動物研究。

(二) 插入基因 (Inserted gene)

在有些情形，插入基因改變，但是載體主幹相同，也可以簡化測試步驟。例如使用相同載體來表現一系列相關的蛋白質時，則安全性的考量主要在於插入基因、基因產物以及品管方面。可能發生的不良反應包括基因產物對病人造成的效應或免疫反應，尤其是在有遺傳缺陷的病人身上，插入基因的過度表現或在不適當的細胞及組織上出現，會有不利影響。若一系列的載體所插入的基因非常類似，且預期的不利影響相同，則每一個載體可不須重複測試。

(三) 定序 (sequencing)

所須提供之載體序列資料，視個案而定，但是載體上與生物性功能相關之組成，都應有序列之分析。對類似之載體，所需提供的資料包括插入基因、鄰近區域及調控區的DNA序列。此外，載體上任何與安全性及功能有關之序列，或是容易受重組或其他改變的部位，也應確認。可使用限制酶圖譜及PCR方式來輔助這些檢測。

二、脂質及其他成份

用來與載體作用以輸入病人體內所用的脂質，若作任何修改，都需提供安全性資料，並提出申請核准始可為之。若此種新脂質已與其他載體配合使用過，可提供相關資料以利審核時決定需進行多少測試。對於臨床前研究之組織分佈、生殖系改變及傳統動物藥理毒性研究等可不需重複進行。但是最好用此新脂質與施用之載體做動物實驗以觀測其基因表現情形。若要加其他脂質成份或使用數種不同形態的同一脂質，則上述之規定也需遵從。

第陸章、基因治療臨床試驗之臨床考量

一、一般考量原則

基因治療臨床試驗和所有臨床試驗一樣，皆須依照GCP(優良臨床試驗準則)執行，統計方法學亦須根據所宣稱之適應症特性與各研發階段目的來設計，在臨床試驗階段，評估基因療法之安全性與有效性，主要取決於下列因素：

- (一) 該基因治療特性
- (二) 該基因治療之臨床應用
- (三) 該基因治療之標的族群(例如：小兒，具生育能力之婦女)
- (四) 該基因治療預定給藥途徑
- (五) 該基因治療預定治療期間

由於在大多數基因治療之情況，目前並無一個合適的動物模型來評估適合人類之起始劑量，故有必要藉由完整了解該基因治療作用機轉與特性來設計完整之臨床研發計畫；例如採用病毒載體(viral vector)時，欲了解該病毒載體注入人體之可能造成之病理後果(pathological consequence)，就必須從其parental strain 已知資訊著手，並考慮該種virus容易影響組織(tissue tropism)。

設計臨床試驗前，必須根據該基因治療先前臨床前藥毒理試驗結果，合理決定試驗之起始劑量和給予時間表，及預定給藥途徑，最重要的是依照該基因治療特性，給予合適之後續安全追蹤計畫。

此外，類似病毒載體在不同治療領域但給藥途徑、劑量時程類似的臨床前試驗結果與已發表之臨床文獻，也可以做為設計後續安全追蹤計畫之重要參考；在作基因治療安全評估時，對於用來運送基因轉殖(gene transfer)的醫療器材，亦須注意其對於整體療效與安全性評估之重大影響。

二、人體藥理學試驗(Human Pharmacology Studies)

基因治療之人體藥理學試驗主要目的如下：

- (一) 根據安全資料決定未來療效試驗使用之適合劑量與時程(Adequate dose and schedule)。
- (二) 對於所選擇之給藥途徑適當性進行確效。
- (三) 儘可能研究攜帶所要之gene sequence之載體進入身體後生體分佈情況(Bio-distribution)，包括：是否分佈至標的器官(或細胞)?有無分佈至其他器官(或細胞)?並確認未來試驗含量是否合適?
- (四) 儘可能確認載體是否具有對特定組織(器官)之專一性(Tissue/organ tropism)，或是具有在理想部位表現transgene之選擇性。
- (五) 評估transgene表現之程度，及研究基因表現與標的細胞(組織)功能性和藥效學

參數之相關性，進一步分析這些觀察到的變化持續期間；這些研究也應擴展到非標的器官組織；若屬DNA疫苗，另外還要觀察產生免疫反應類型，並作為療效資料之一。

(六) 評估該基因治療可能相關之短期副作用。

一般而言，初期試驗可先研究單次投與，隨後再研究多次投與並配合藥效學觀察指標：若可行，建議初期試驗採用標的族群(Target population)配合未來欲使用之給藥途徑；劑量調升過程之每個劑量cohort，亦應有足夠之樣本數。

三、療效試驗

一旦收集足夠基因治療產品的生物分佈(或藥動學)資訊與藥效學數據，即可開始進行療效試驗；最佳劑量與投與時程應根據初步安全性評估與體內治療性基因表現證據而決定，而能反映體內生物活性之定量強度(Potency)檢測方法也應建立。

一般而言，基因治療產品的療效試驗應採用隨機分配對照試驗，所選擇之代表療效之觀察指標必須為經確效之臨床指標或替代指標；試驗之對照必須能反映所宣稱適應症目前臨床上常用治療方式；然而，某些罕見情形(若有well-defined clinical outcome)下，採用無對照組設計有時也可被接受；若選擇安慰劑做對照組，則必須在倫理上與臨床上說明其合理性。

四、安全性考量

在臨床研發階段必須依照不同類型基因治療，去收集一般性副作用與產品特定性副作用(可由已發表文獻或臨床前試驗所獲知相關資訊來預見)，不同類型產品之特殊考量請參見本規範第三章，臨床前試驗所觀察到的現象可用以決定臨床試驗投與後所需臨床監測觀察時間與範圍，以協助建立產品之臨床安全數據表，對於基因治療短期與長期可能造成之不良反應，皆須要謹慎考量。

雖然某些不良反應在基因治療產品初次用於人體後就可以被觀察到，但完整的臨床安全數據表可能不那麼容易被識別而須要對受試者長期追蹤；必須針對下述重點項目作考量：

(一) 病毒安全監測

1. 當選用non-replication competent virus or conditionally-replicating virus作為載體時，要注意是否出現replication competent virus(例如: Replication competent adenovirus或Replication competent retrovirus)。
2. 要注意是否在in vivo重組產生re-assortant wild-type viruses，特別是採用人類致病原衍生之defective virus時要更注意。
3. 在cell-based基因治療產品，要注意是否會釋放出endogenous viruses。
4. 要收集適當數目患者與適當監測時間，以觀察是否出現viral shedding。

(二) 由於非意圖之轉殖感染(unintended[ectopic] transfection)及其所伴隨之病理後果導致之細胞功能性變化。

(三) 針對因過久之外來蛋白質表現(prolonged expression of foreign protein)導致臨床作用之追蹤。

(四) 免疫系統監測：為了確認是否具有引起細胞免疫或賀爾蒙免疫潛能，並將下述所引起之免疫反應與相關副作用減到最低

1. 運送系統(delivery system): 如: whole cell or others。
2. 病毒載體本身。
3. 載體表現物質(vector expressed material)
4. Transgene表現產生之蛋白質
5. 本身(自體免疫)

任何針對載體或產品之免疫反應都可能對於基因治療產品之療效有不良影

響，進而導致臨床安全性問題，臨床前免疫毒理學研究(immunotoxicology)可幫助解讀臨床試驗所觀察到的一些安全發現，雖然有些情形下，增強免疫反應對於一些特定適應症可能有好處，但必須說明其理論基礎，並評估是否有產生其他非意圖反應。

(五) 基因體嵌入(genomic integration)潛能：包括意圖或非意圖之情形及其後果皆須完整研究，例如: Insertional mutagenesis；然而，此類現象不易於臨床試驗中偵測，故應儘可能於試驗結束後，對受試者長期追蹤此特定情況。

(六) 投與基因治療產品過程要注意醫療照顧者之保護，以避免意外接觸產品。

五、病人安全監測

基因治療產品對患者之安全監測，可分為短期監測和長期監測：

(一) 短期監測: 主要包括在human pharmacology study與efficacy studies中，可研究之相關早期毒性包括：general or organ-specific toxicities, viral safety, immunotoxicities與 gene transfer vector之消除。

(二) 長期監測: 主要評估基因表現與基因移植過程之穩定性，並針對否些安全疑慮作追蹤，例如: 基因嵌入(gene integration)可能造成之長期後果、所使用之載體可能在非特定類型細胞進行transduction、過久之外來蛋白質表現及所選用之病毒載體。

由於有下列因素考量，無法對於所有的基因治療產品作相同之長期安全性追蹤要求：

(一) 並非所有基因治療產品可能產生延遲性不良事件(delayed adverse event)之危險性皆相同，故應該針對其產品特性給予不同之長期安全性追蹤建議，而非對所有基因治療產品採相同要求。

(二) 某些類型試驗之受試者顯然不適合進行有意義的長期追蹤觀察，這可能是因

為這些受試者有很高短期死亡率，或是健康情況太差，或是可能暴露在其他致突變物質(mutagenic agents)。

一般而言，對於延遲性不良反應危險性較低之基因轉殖技術，並不會一定要求長期追蹤觀察(long-term follow-up observations)，廠商必須依照所有可取得之臨床前與臨床證據去評估此風險，例如自身產品與相似產品所得之所有試驗資訊，一旦累積資訊顯示有此風險，曾須要變更試驗計畫書增加長期追蹤觀察，此風險評估為一個持續之過程，例如若有最新證據顯示一個被確認之風險(identified risk)，則計畫書需要增加長期追蹤觀察計劃來減緩此風險；同樣的，若有累積足夠證據顯示某產品與延遲性不良反應危險性關聯性很低，則計畫書可能可以減少或刪去長期追蹤觀察計劃，參考相同vector class，相同給藥途徑與相同適應症之使用經驗，對於評估風險很有幫助。

建議可依照以下系列問題來做臨床風險等級評估”評估基因治療相關延遲性不良反應的發生風險步驟(Framework to Assess the Risk of Gene Therapy-Related Delayed Adverse Events)”(見附圖一)，若依照下列問題所得答案顯示發生延遲性不良反應危險性較低，則可能就不需要長期追蹤觀察計劃來減緩此風險，臨床前資訊可協助回答下列問題一到問題三：

問題一：基因產品是只用於活體外(ex vivo)修飾後細胞？如果不是，請繼續回答第二題；如果是，請直接跳至第三和第四題。

問題二：臨床前試驗的結果，載體的基因序列會持續表現嗎？如果不是，產生基因治療相關的延遲性不良反應之風險較低，可能不一定需要長時間的持續觀察追蹤；如果基因會持續表現，請繼續回答第三題和第四題。

如果不清楚產品載體的表現狀況，為了進行風險評估，建議先假設載體會持續表現，或是在合適的動物模式中執行臨床前試驗來評估載體在生物體內分佈與持續表現情形，對於此種動物試驗模型選擇或是試驗設計與觀察期間有疑問，請儘早

與本署食品藥物管理局諮詢。

問題三：載體基因序列是嵌入式(integrated)的嗎？如果不是，請繼續往下回答第四個問題，如果是，在臨床試驗計劃書中應包含臨床長期追蹤觀察。

問題四：載體可能是潛伏性(latency)或再活化(reactivation)？

如果不是，發生基因治療有關的延遲性不良反應的風險較低，長期的追蹤觀察也許不一定需要。如果載體是潛伏性或有可能重新活化，臨床試驗計劃書中應包含臨床長期追蹤觀察。

相似產品的臨床前試驗結果與實驗室的數據，可以作為評估出現延遲性不良反應風險的證據，如果有其它相似產品清楚明確的證據，也可以用於評估申請臨床試驗產品的風險性。

當有以下三種情形時，建議在臨床試驗計劃書中訂定長期追蹤監控延遲性不良反應的計畫：

- (一) 臨床前毒理試驗顯示轉入基因的表現可能會有延遲毒性產生。
- (二) 轉入基因取代受試者本身基因的功能或轉入基因的產物可能是免疫原。
- (三) 在短期的臨床試驗數據顯示載體會持續存在，雖然在臨床前試驗中顯示此載體不會持續存在。

上述問題三與問題四，目前已知有三種病毒載體 viral vectors (Gammaretrovirus, Lentivirus, and Herpesvirus)被認為具有延遲性不良反應之高風險性，Gammaretrovirus與 Lentivirus已有文獻確認具有嵌入式(integrated)能力，而Herpesvirus已有文獻確認具潛伏性(latency)或再活化(reactivation)之潛力，雖然在潛伏期為不活性狀態(inactive)，但仍可能在初始暴露後數月至數年再活化(reactivation)；因此，若使用此三種viral vector，將被要求臨床試驗計劃書中應包含臨床長期追蹤觀察計劃。

大多數可用於臨床試驗之載體Vectors可依照其嵌入(integrate)宿主DNA的習性分類，請見下附表(目前常用於臨床試驗的基因治療載體，其嵌入的習性“Integration Properties of Current Commonly Used Gene Therapy Vectors in Clinical Trials.”)。

表二：目前常用於臨床試驗的基因治療載體，其嵌入的習性。

載體形式	嵌入(integrate)的習性 ¹	長期追蹤觀察 ²
質體 (Plasmid)	無	不需要
痘病毒 (Pox Virus)	無	不需要
腺病毒 (Adenovirus)	無	不需要
腺衛星病毒 (adeno-associated virus) ³	無	不需要
皰疹病毒 (Herpes virus)	無，但也許會潛伏 (latency)或重新活化 (reactivation)	需要
γ反轉錄病毒 (Gammaretrovirus)	有	需要
慢病毒 (Lentivirus)	有	需要

¹ 根據載體的設計(如缺乏任何已知會促進嵌入的機制)和目前已累積的臨床前與臨床證據，支持載體不會嵌入或是嵌入的機率很低。

² 當轉入基因持續表現，但是並非是嵌入受試者本身的基因之特殊狀況下，長時間持續的追蹤觀察是減少受試者風險的方法。這種情況需要考慮更多其他的判斷準則，例如轉入基因的表現或是臨床的適應症。

³ 僅 *Rep-negative* 載體。

然而，有時載體嵌入(integrate)的能力會因為要增加其作為基因治療之應用性時被修改(modified)，例如Adenovirus vector可以被修改誘發其DNA之嵌入；另一個例子為，改變plasmid DNA vector進入細胞之方式，可以導致較高頻率之嵌入；上述這些對於基因治療系統之修改皆可能改變基因之持續性或嵌入特性，故建議廠商採取下列措施：

首先選擇合適的動物模型進行載體持續性(vector persistence)之臨床前研究，進行此試驗前，請儘早諮詢本署食品藥物管理局。若是試驗結果顯示：

- (一) 本vector不具持續性(persistence)，則與延遲性不良反應危險性關聯性很低，則計畫書是否須包含長期追蹤觀察計劃可由廠商自行決定。
- (二) 本vector具持續性(persistence)，則需進行vector integration及潛伏性(latency)或再活化(reactivation)之臨床前研究，若試驗結果：
 1. 未顯示因為基因物質嵌入或發展為潛伏期之持續性，則與延遲性不良反應危險性關聯性很低，則計畫書是否須包含長期追蹤觀察計劃可由廠商自行決定。
 2. 雖未顯示基因物質嵌入，但潛伏期與再活化試驗未能得出結論或無法進行，或甚至顯示具潛伏性(latency)或再活化(reactivation)之潛力，則發生延遲性不良反應危險性無法確認，將要求在臨床試驗計劃書中訂定長期追蹤監控延遲性不良反應的計畫。
 3. 若vector integration之臨床前研究無法執行，或若基因物質嵌入發生，或若載體表現出於潛伏期之持續性且可能再活化，則發生延遲性不良反應危險性為高或未知，亦將要求在臨床試驗計劃書中訂定長期追蹤監控延遲性不良反應的計畫。

若vector integration之臨床前研究並未執行，建議廠商邀提供其他證據支持評估該載體並未具發生延遲性不良反應之高危險性，必須包括以下資訊：

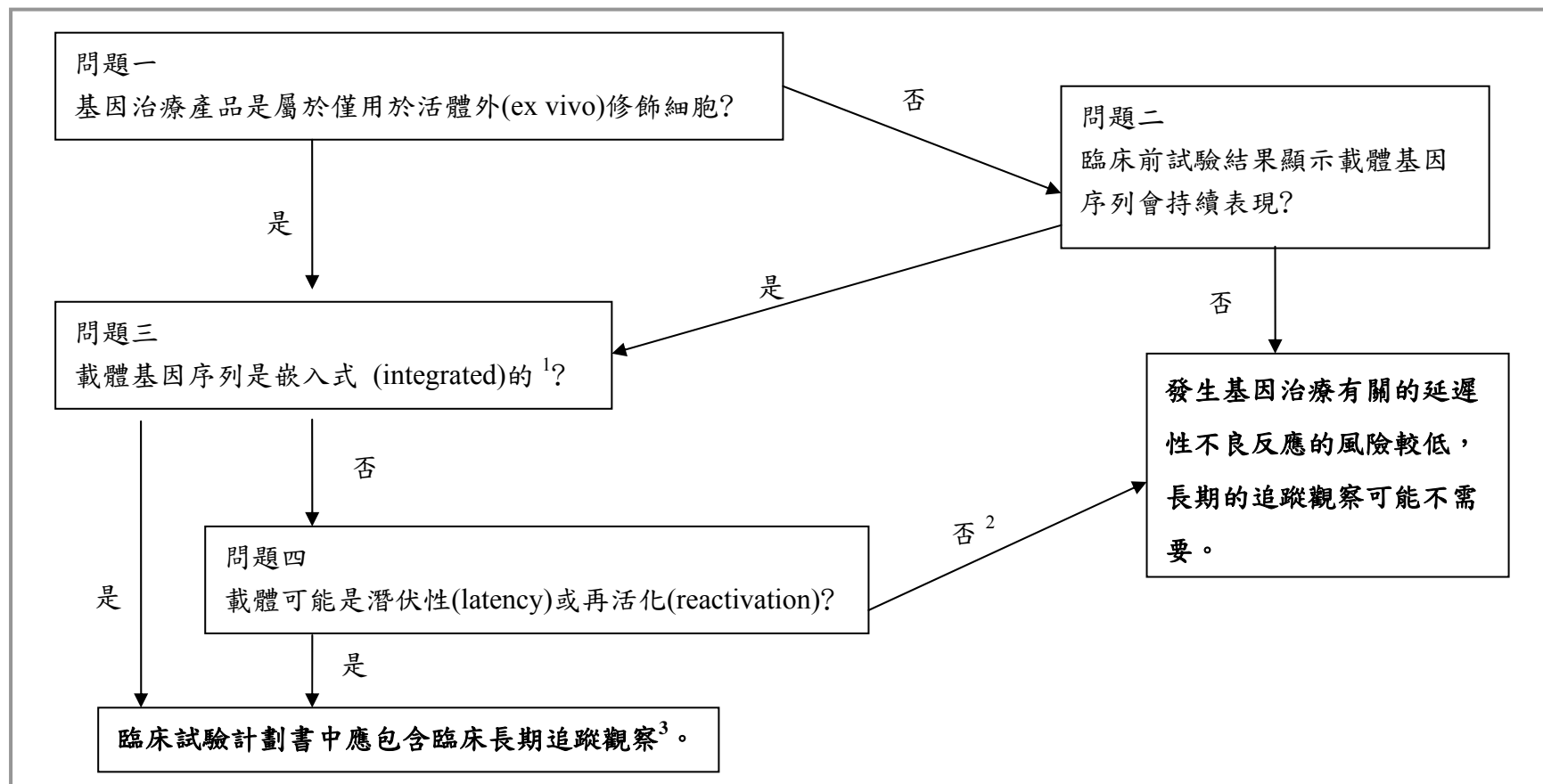
- (一) 為何未執行vector integration之臨床前研究？
- (二) 證據支持評估該載體並未具發生延遲性不良反應之高危險性。

附表之Plasmids, poxvirus, adenovirus, and adeno-associated virus-based vectors (AAV)因未具基因嵌入(integrate)習性，或較不易在潛伏後再活化，目前可被視為發生基因治療相關延遲性不良反應危險性較低，然而，即使所選取

之viral vector 被視為未具基因嵌入(integrate)習性，或較不易在潛伏後再活化，但是臨床前研究或臨床試驗顯示具基因持續性(persistence)，則將會升高發生基因治療相關延遲性不良反應危險性之顧慮，將可能被要求在臨床試驗計劃書中訂定長期追蹤監控延遲性不良反應的計畫。舉例而言，若AAV vector顯示具有transgene持續表現，因可能發生自體免疫現象，而則須考慮衍生延遲脫軌免疫反應之風險。

另外，若有些目前被視為具較高發生基因治療相關延遲性不良反應危險性之載體，可能在未來因為被修改而減低其危險性，廠商若有此方面資料，可提供該新型載體(novel vector)的相關資料來協助評估是否可支持其降低發生基因治療相關延遲性不良反應危險性之宣稱，進而評估是否可減免長期追蹤監控延遲性不良反應的計畫。

圖一：評估基因治療相關延遲性不良反應的發生風險步驟。



¹ 如果證明基因治療使用的載體是有嵌入習性或是經過設計促進嵌入，答案是「是」。如果沒有證據顯示載體的嵌入習性，建議執行臨床前試驗來評估載體的嵌入的可能性。

² 在臨床試驗申請通過後，從自身或其他人研究發現如轉入基因會持續表現，或在接受該產品後，有進一步的證據確認延遲性不良反應發生的風險增加，雖然在申請時評估為不需要長期追蹤觀察，但仍需要再次重新提出長期追蹤觀察計畫書。

六、長期安全監測計畫撰寫原則

- (一) 於計畫書中，應根據前節所述原則，說明本基因治療產品發生基因治療相關延遲性不良反應危險性之評估，決定本臨床試驗是否應進行長期追蹤觀察計畫。
- (二) 於計畫書中，應分析本試驗所收納之族群，是否適合進行長期追蹤觀察計畫，應考慮因素如：預期壽命很短，患者合併多種重症(multiple morbidities)或是受試者同時暴露在其他也會造成延遲不良反應之治療下。相反的，對於疾病嚴重度較受限制或是處於無疾病狀態的患者，合併較少 morbidities，或較低曝露在其他也會造成延遲不良反應之治療下之受試族群，長期追蹤觀察計畫可提供很高之價值。
- (三) 一般而言，合理的長期追蹤觀察計畫最少要追蹤15年，若廠商可提供下列資料，以評估是否可縮短此觀察期：
1. 體內載體持續性試驗 (in vivo vector persistence)之觀察期間。
 2. 體內 transgene 表現試驗 (in vivo transgene expression)之觀察期間。
 3. 試驗族群在 gene therapy 之前、之後、與合併其他治療情況。
 4. 試驗族群預期存活率。
 5. 其他會影響長期追蹤觀察計畫可行性或科學價值之因素。
- (四) 主持人必須準備和維持適當和準確的個案病史，並記錄所有基因治療後之觀察與其他相關檢測結果。進入試驗前之基礎病史，包括所有疾病與不正常之觀測值等皆要記錄，最好是能建立一個系統平台以利於參與試驗人員來記錄通報給主持人，對於計畫書排定之訪視，亦要小心記錄相關資訊與 persistent vector sequence 之檢測結果，若是該類檢測較為侵襲性，亦可選用替代性檢測方法來測試 persistent vector sequence。

(五) 長期追蹤觀察計畫之前五年，應注意下列事項：

1. 導入偵測基因治療相關延遲性不良反應之方法學。
2. 確保主持人維持詳細病史紀錄，須包括暴露在所有可能致突變之物質或其他治療產品之情況，並須能取得受試者不良反應資料。
3. 設計計畫書排定之訪視(至少每年一次)來發現並記錄每位受試者新的發現(包括病史，身體檢查，實驗室檢測等)。
4. 建立主持人記錄下列事件之方法學：
 - (1) 新發現之惡性腫瘤(New malignancies)
 - (2) 已存在神經性疾患惡化或新發生(New incidence or exacerbation of a pre-existing neurologic disorder)
 - (3) 已存在風濕性或其他自體免疫疾患惡化或新發生(New incidence or exacerbation of a prior rheumatologic or other autoimmune disorder)
 - (4) 新發生血液性疾患惡化(New incidence of a hematologic disorder)
5. 設計與受試者及其醫療照顧提供者合作進行延遲不良反應知通報機制，包括未預期疾患與住院。

(六) 長期追蹤觀察計畫之後續十年，應注意下列事項：

1. 每年聯絡受試者至少一次，除非有特定額外實驗室之外篩檢，可採用電話或書面問卷取代返診訪視。
2. 對於先前檢測顯示載體持續性之個案，持續追蹤其載體序列狀態，在長期追蹤期間，至少每年檢測一次persistent vector sequences，直到它們變為偵測不到為止。選用之偵測方法必須對載體序列具足夠敏感性，建議採檢可能被transduced 之細胞群，以避免對受試者過度侵襲性，例如採檢週邊血液替代骨髓切片來檢測造血幹細胞；但某些其況，可能需要較

侵襲方式才能取得transduced 細胞，則建議採取可代表載體持續性 (vector persistence)之替代測試(surrogate test)，例如所偵測產生transgene product之量或是其臨床反應，若所得之資訊顯示皆無可偵測之載體時，廠商可以檢送試驗計畫書變更，修改長期追蹤觀察計畫，若有此情形，必須同時送交整體風險評估分析報告至署。

七、對於嵌入性載體(integrating vector)之特殊考量

對於具嵌入能力之載體，如: retroviral vectors 或 cells modified ex vivo by retroviral vectors, gammaretroviruses or lentiviruses，因文獻已報告在動物實驗與人體試驗中，retroviral vectors 有嵌入受試動物細胞或受試者細胞，進而產生 malignancies 狀況，retroviral vector 相關監測方式請參見本規範第三章第二節，若在國內申請此類風險較高載體基因治療臨床試驗前，請先諮詢本署食品藥物管理局，以評估所訂定長期追蹤觀察計畫是否合理，同時在受試者同意書中必須揭露類似載體之相關安全資訊。

附錄

[附錄 1-1] 決定 RCR 測試容積之數學推算

假設生產批次中RCR病毒的濃度為c，並且對生產批次進行能偵測到單一反轉錄病毒的分析實驗，其偵測機率為p，因為RCR病毒在Vt容積中的數量是以Poisson分布(Poisson distribution)，因此得方程式為 $p = 1 - \exp(-cVt)$ ，為解得Vt值，可循下列方程式：

$$Vt = -(1/c) \ln(1-p)$$

ln為自然對數

p值

在這一方程式中，p的建議值設為0.95。在[附錄1-3]中的建議複製容積及複製數量，p則代表在生產批次中偵測到單一RCR病毒的機率。

c值

c值建議設在1毫升溶液中含不高於0.01個RCR病毒的濃度(0.01RCR/ml)，或是100毫升溶液中含不高於一個RCR病毒的濃度(1RCR/100ml)。如果生產批次的RCR病毒濃度為大於或等於0.01RCR/ml，則偵測機率至少為0.95。如果生產批次的RCR病毒濃度為小於0.01RCR/ml，則無法偵測到RCR病毒，此製劑可投予病人。

Vt值

p與c的建議值既已設定，反轉錄病毒上清液的測試用總體積 (Vt)，與生產批次的大小無關，可以如下公式計算：

$$V_t = -(1 / 0.01 \text{ RCR/ml}) \ln (1-0.95) \approx 300\text{ml}$$

如建議使用比300毫升更小的測試體積，則應該在研發後與先與本局諮詢。

[附錄 1-2] 分析敏感度的實驗裁決

ATCC已建立一個標準的反轉錄病毒種源(ATCC # VR-1450)，可以用來決定偵測RCR的分析方法的敏感性與有效性，而此分析方法是為了偵測具複製力的RCR反轉錄病毒的存在與否。這個反轉錄病毒可以由含有兩棲包膜(amphotropic envelope)的VPC生產而來。這一個標準病毒種源可以用來決定偵測RCR病毒分析方法的相對敏感度，如可被使用在決定反轉錄病毒上清液的量，俾能偵測到單一反轉錄病毒的所需充分容積 V_t [附錄1-3]。VR-1450病毒種源是由MoMLV (Moloney murine leukemia virus)之分子選株(molecular clone)轉導一永久細胞株培養而來，而這一個MoMLV分子選株的原包膜則由兩棲老鼠白血病毒(amphotropic murine leukemia virus, A-MLV)之4070A品種之包膜基因序列所取代。因此，這一個病毒種源是一個典型的基因重組病毒，此病毒可以由一個含有MLV包膜基因序列之反轉錄病毒的生產細胞所製造。本ATCC標準病毒種源之感染力價的訂定是利用S+L- PG-4直接分析，並經由不同實驗室評估決定本標準病毒種源之感染力價。第一批次標準種源病毒的感染力價為 $6.9 \times 10^7 / \text{ml}$ 加減標準誤差(+/-SD) (三次實驗所得標準誤差為 $2.0 \times 10^7 / \text{ml}$)。解凍與重複冷凍將降低感染力價為 $3.7 \times 10^7 / \text{ml}$ (標準差為 $4.7 \times 10^6 / \text{ml}$)。本ATCC標準病毒種源應定期補充力價，致其感染力價達到原先批次。

這一個標準病毒種源及其感染力價的病毒可以用作陽性的實驗對照組，以決定RCR病毒偵測法的相對敏感度。特別是，本ATCC標準病毒可被用來決

定能偵測一個RCR病毒所需的最大測試體積。為了控制在偵測RCR病毒時，反轉錄病毒載體粒子可能產生抑制反應，因此，這最大體積的測定，必須在一般生產批次的反轉錄病毒載體上清液存在之下進行。這一個標準病毒種源的建立，使得個別的研究員可以建立屬於自己實驗室的評估方法，並且可進一步用以研發新的RCR病毒偵測法。

[附錄 1-3] 試驗之重複取樣數量之計算公式

將總測試容積分成數個”重複取樣”的樣本r，可由下列方程式而得(RCR標準液，請參看[附錄1-2])

$$r = V_t / V_s$$

V_s 為單一個RCR病毒顆粒可以正確且一致地被偵測到的容積(V_s 容積的定量，請參看[附錄1-2])。例如，如果一個RCR病毒可以在2ml的容積下被偵測到，那麼總容積為300ml的樣本可以分成 $300/2 = 150$ 個 V_s ”重複取樣”樣本，或是150個2ml的”重複取樣”樣本。

參考文獻

1. 人體細胞組織優良操作規範，衛署醫字第 0910078677 號公告，民國 91 年。
2. 藥物非臨床試驗優良操作規範，行政院衛生署，民國 95 年。
3. Guidance for human somatic cell and gene therapy, US FDA, 1998.
4. Guidance for FDA reviewers and sponsors: content and review of chemistry, manufacturing, and control (CMC) information for human gene therapy investigational new drug applications (INDs), US FDA, 2008.
5. Guideline for industry: supplemental guidance on testing for replication competent retrovirus in retroviral vector based gene therapy products and during follow-up of patients in clinical trials using retroviral vectors, US FDA, 2006.
6. Note for guidance on Quality, non-clinical and clinical issues relating specifically to recombinant adeno-associated viral vectors, EMA, 2001
7. Guideline on Follow-up of patients administered with gene therapy medicinal products, EMA, 2010
8. Guidance for Industry: Gene Therapy Clinical Trials – Observing Subjects for Delayed Adverse Events, US FDA, 2006